



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 <b>C12N 9/20, 15/55 // (C12N 9/20, C12R 1:38) (C12N 15/55, C12R 1:38)</b>		A1	(11) 国際公開番号 <b>W096/27002</b>
(21) 国際出願番号 <b>PCT/JP96/00426</b>		(22) 国際出願日 <b>1996年2月23日(23.02.96)</b>	(43) 国際公開日 <b>1996年9月6日(06.09.96)</b>
(30) 優先権データ 特願平7/38527 1995年2月27日(27.02.95) JP		(81) 指定国 AU, CN, FI, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	添付公開書類
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 昭和電工株式会社(SHOWA DENKO K.K.)(JP/JP) 〒105 東京都港区芝大門1丁目13番9号 Tokyo, (JP)		(72) 発明者: および (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 米田 正(YONEDA, Tadashi)(JP/JP) 高田晴美(TAKADA, Harumi)(JP/JP) 大野 桂(OHNO, Kei)(JP/JP) 貴家潤治(SASUGA, Junji)(JP/JP) 〒267 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内 Chiba, (JP)	国際調査報告書
(74) 代理人 弁理士 大家邦久, 外(OHIE, Kunihisa et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo, (JP)			

(54) Title : NOVEL LIPASE GENE AND PROCESS FOR THE PRODUCTION OF LIPASE WITH THE USE OF THE SAME

(54) 発明の名称 新規なリバーゼ遺伝子及びそれを用いたリバーゼの製造方法

## (57) Abstract

A lipase gene isolated from the chromosomal DNA of *Pseudomonas* sp. SD705 strain (FERM BP-4772); a gene encoding a protein which participates in the production of a lipase; and a process for the production of the lipase with the use of these genes. The use of these genes makes it possible to efficiently produce a lipase which is industrially useful in detergents, food processing, paper making, oil manufacturing, etc.

(57) 要約

シュードモナス s p. (Pseudomonas sp.) S D 7 0 5 株 (FERM BP-4772) の染色体DNAより単離されたリパーゼ遺伝子及びリパーゼの生産に関するタンパク質をコードする遺伝子、それら遺伝子を使用するリパーゼの製造方法を提供する。

本発明の遺伝子を使用することにより洗剤用、食品加工用、製紙工業用、製油工業用等産業上有用なりパーゼを効率的に生産することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FIR	フィンランド	ST	レソトニア	SE	スエーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LU	リトアニア	SG	スウェーデン
BB	バルバドス	GAB	ガボン	LV	ルクセンブルグ	SI	シンガポール
BEE	ベルギー	GB	イギリス	MC	ラトヴィア	SK	スロバキア
BFF	ブルガニア・ファズ	GE	グルジア	MD	モナコ	SN	スロバカル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	モルドバ共和国	SZ	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マダガスカル	TD	セネジランド
BR	ブラジル	HUE	ハンガリー	ML	マケドニア	TG	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モルドバ共和国	TJ	トーゴ
CA	カナダ	ILS	イスラエル	MR	モーリタニア	TM	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	アイスランド	MW	モーリシャス	TR	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	イタリア	MX	モラウイ	TT	トルコ
CH	イス	KE	日本			TR	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール					UA	ウクライナ

## 明細書

## 新規なリパーゼ遺伝子及びそれを用いたリパーゼの製造方法

5

## 技術分野

本発明は洗剤用、食品加工用、製紙工業用、製油工業用等の産業上有用な脂質分解酵素である新規なリパーゼをコードする遺伝子およびそのヌクレオチド配列、そのリパーゼの生産に関するタンパク質をコードする遺伝子およびそのヌクレオチド配列、それらの遺伝子を含む組換えベクター、組換えベクターを含む形質転換細胞、形質転換細胞を用いたリパーゼの製造方法に関する。

## 背景技術

リパーゼを生産する微生物としては、シュードモナス (Pseudomonas 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、ムコール (Mucor) 属、キャンディダ (Candida) 属、フミコーラ (Humicola) 属、リゾムコール (Rizomucor) 属などが知られている。これらの中には遺伝子が取得されているものがいくつかあるが、なかでもシュードモナス (Pseudomonas 属に属する微生物のリパーゼ遺伝子が数多く取得されている。これまでに知られているものとしては、シュードモナス・フラジ (Pseudomonas fragi) (特開昭62-228279号、特開平2-190188号)、シュードモナス・セパシア (Pseudomonas cepacia) (特開平3-47079号、特開平3-87187号)、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) (EP268452)、シュードモナス・シュードアルカリゲネス (Pseudomonas pseudoalcaligenes) (特開平3-500845号)、シュードモナス・アエルギノザ (Pseudomonas aeruginosa) (EP334462)、シュードモナス・グルマエ (Pseudomonas

as glumae) (Appl. Envir. Microbiol. (1992) 58, 3738-3791)、シュードモナス・フルオレセンス (Pseudomonas fluorescens) (Appl. Envir. Microbiol. (1992) 58, 1776-1779) がある。

一部のシュードモナス (Pseudomonas) 属細菌におけるリパーゼの生成には、リパーゼ構造遺伝子下流の遺伝子領域がコードしているタンパク質が関与していることが知られている。シュードモナス・セパシア (Pseudomonas cepacia) におけるリパーゼの生成には宿主微生物の種類に関わらずこの下流領域遺伝子が必須である (EP331376)。シュードモナス・グルマエ (Pseudomonas glumae) の産するリパーゼは、宿主微生物の種類に関わらずリパーゼの安定化効果を示すタンパク質がこの領域にコードされていることが知られている (EP464922)。

一方シュードモナス・シュードアルカリゲネス (Pseudomonas pseudoalcaligenes) では、ホモロガスな宿主・ベクターを用いた系では生産量増大効果を示すが、ヘテロロガスな宿主・ベクターを用いた系でのリパーゼ生産にはこの下流領域遺伝子は必須ではない (EP334462)。またシュードモナス・フラジ (Pseudomonas fragi) ではこの下流領域遺伝子は存在しない。

リパーゼを洗剤に配合して被洗浄物に付着した脂質を分解除去し洗浄効率を向上できることは従来より知られている。この用途は、アンドレー (H. Andree) らによる「洗浄剤成分としてのリパーゼ」 (Lipase as detergent components) と題する報文 (Journal of Applied Biochemistry, 2, 218-229(1980)) 等に記載されている。

好ましい洗剤配合用のリパーゼは、洗濯液中で充分にリパーゼ活性が機能するものである。通常の洗濯条件では洗浄液の pH がアルカリ性領域にあるため、アルカリ性 pH で機能するリパーゼが求められる。また、一般に脂質汚れは高温高アルカリ条件下では比較的除去されやすいが、

低温（60℃以下）の洗浄では充分に脂質汚れを除去できないことが知られている。従来より主として低温洗濯が行われているわが国はもとより、欧米においても洗濯温度は低温化する傾向にあり、従って好ましい洗剤配合用リパーゼは、低温でも充分に機能するものである。また、好ましい洗剤配合用リパーゼは界面活性剤等の洗剤成分や、多くの洗剤に含まれているプロテアーゼや漂白剤存在下でも洗濯時に充分機能を発揮し得るものである。さらに、好ましい洗剤配合用リパーゼは、洗剤に配合した状態で保存するときにも共存する洗剤含有成分に対して安定であるものである。

リパーゼを生産する微生物としては、シュードモナス (Pseudomonas 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、ムコール (Mucor) 属、キャンディダ (Candida) 属、フミコーラ (Humicola) 属、リゾムコール (Rhizomucor) 属などが知られているが、これらの菌株から得られる大部分のリパーゼはその至適pHが中性から微アルカリ性にあるため、アルカリ性の洗剤溶液中で充分にリパーゼが機能せず、また、洗剤溶液中での安定性も低い。さらには、アクロモバクター (Achromobacter) 属、ムコール (Mucor) 属、キャンディダ (Candida) 属、フミコーラ (Humicola) 属の各リパーゼは、アニオニ性界面活性剤の存在下においてその活性を強く阻害される。

また、リパーゼを生産するシュードモナス (Pseudomonas) 属に属する微生物としては、シュードモナス・フラジ (Pseudomonas fragi)、シュードモナス・セパシア (Pseudomonas cepacia)、シュードモナス・シュードアルカリゲネス (Pseudomonas pseudoalcaligenes)、シュードモナス・エルギノザ (Pseudomonas aeruginosa)、シュードモナス・フルオレセンス (Pseudomonas fluorescens) などがあるが、これらの菌株から得られる公知の酵素も前記の特性を満足するものではない。

## 発明の開示

本発明は、洗剤用等の工業分野に用いられる優れた特性を有するリパーゼ、特に S D 7 0 5 株 (FERM BP-3772) 由来のリパーゼ S を効率よく 5 生産する方法に関する。

さらに詳しくいえば、本発明は、前記リパーゼ S をコードする遺伝子 およびそのヌクレオチド配列、リパーゼ S の生産に関与するタンパク質をコードする遺伝子およびそのヌクレオチド配列、かかる遺伝子を含む組換えベクター、かかる組換えベクターで形質転換された形質転換細胞、 10 かかる形質転換細胞よりリパーゼ S を製造する方法に関する。

## 図面の簡単な説明

図1はプラスミド p S 1 の制限酵素地図である。

図2はプラスミド p S 1 S の制限酵素地図である。

15 図3はプラスミド p S 1 E の制限酵素地図である。

図4はプラスミド p S L 1 の制限酵素地図である。

図5はプラスミド p S L 2 の制限酵素地図である。

図6はプラスミド p S P 1 の制限酵素地図である。

図7はプラスミド p S P 2 の制限酵素地図である。

20 図8はプラスミド p A P 1 、 p A P 2 、 p A P 3 の構築図である。

図9はプラスミド p S B 1 の構築図である。

図10はプラスミド p S B 2 の構築図である。

## 発明の詳細な説明

25 本発明者らは、まず洗剤等の用途に有用なリパーゼ S 生産菌の1つであるシードモナス属細菌であり、本出願人により工業技術院生命工学

工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託され、  
ブダペスト条約に基づく国際寄託に移管されたシュードモナス s p. (Ps  
eudomonas sp.) S D 7 0 5 株（受託番号FERM BP-4772）より、リパーゼ  
Sをコードする遺伝子およびその生産に関するタンパク質をコードす  
る遺伝子を含むDNA断片を取得した。このDNA断片を宿主細胞に導  
入し、得られた形質転換細胞を培養した培養物中にリパーゼSが得られ  
ることを確認し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のものを提供するものである。

- 1) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列をコードする遺伝子。
- 10 2) 配列番号2に記載されたリパーゼをコードするヌクレオチド配列を  
含む遺伝子。
- 3) 配列番号3に記載されたアミノ酸配列をコードする遺伝子。
- 4) 配列番号4に記載されたリパーゼの生産に関するタンパク質をコ  
ードするヌクレオチド配列を含む遺伝子。
- 15 5) シュードモナス (Pseudomonas) 属細菌由来の前記1) ないし4)  
のいずれかに記載の遺伝子。
- 6) シュードモナス s p. (Pseudomonas sp.) S D 7 0 5 株（受託番号FE  
RM BP-4772）由来の前記1) ないし4) のいずれかに記載の遺伝子。
- 7) 前記1) ないし6) のいずれかに記載された遺伝子のヌクレオチド  
20 配列の全部もしくは一部を含むDNA。
- 8) 前記3) または4) に記載された遺伝子のヌクレオチド配列の全部  
もしくは一部とハイブリダイズするDNA。
- 9) 前記1) ないし4) のいずれかに記載された遺伝子の少なくとも1  
つを宿主微生物細胞内で発現するように宿主微生物細胞内で複製可能な  
ベクターに組み込んだ組換えDNA。
- 25 10) 前記1) ないし4) のいずれかに記載された遺伝子の少なくとも

1つを微生物染色体上に相同組換えによって組み込んだ組換え染色体DNA、

11) 前記9)に記載の組換えDNAで形質転換された形質転換宿主微生物。

5 12) 前記10)に記載の組換え染色体DNAを含む形質転換微生物。

13) 微生物がエスシェリシア(Escherichia)属細菌、シュードモナス属細菌(Pseudomonas)、またはバチルス属細菌(Bacillus)である前記11)記載の形質転換微生物。

10 14) 微生物がシュードモナス属細菌(Pseudomonas)、またはバチルス属細菌(Bacillus)である前記12)記載の形質転換微生物。

15 15) 微生物がシュードモナス・アルカリゲネス(Pseudomonas alcaligenes)、シュードモナス・シュードアルカリゲネス(Pseudomonas pseudoalcaligenes)、シュードモナス・メンドシナ(Pseudomonas mendocina)、またはバチルス・ズブチリス(Bacillus subutilis)である前記11)または12)記載の形質転換微生物。

20 16) 微生物がシュードモナスs.p. (Pseudomonas sp.) SD705株(受託番号FERM BP-4772)、シュードモナス・メンドシナ(Pseudomonas alcaligenes) SD702株(受託番号FERM BP-4291)、バチルス(Bacillus) NKS-21株(受託番号FERM BP-93-1)、またはそれらの変異株である前記11)または12)記載の形質転換微生物。

17) 前記11)ないし16)のいずれかに記載の形質転換宿主細胞の少なくとも1つを培養してリパーゼを含む培養物を得、リパーゼを単離することを特徴とするリパーゼの製造方法。

以下本発明について詳細に説明する。

25 [遺伝子の単離]

本発明において、リパーゼをコードする遺伝子は、コロニーハイブリ

ダイゼーションや平板培地上でのクリアゾーンの形成といった公知の方法で染色体DNAから単離することができる。すなわち、まず染色体ライブラリーを作成する。次にリパーゼの全部または一部のアミノ酸配列が判っている場合には、その部分に相当するオリゴヌクレオチドプローブを作製し、それを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行うことにより、リパーゼをコードする遺伝子を単離することができる。

リパーゼのアミノ酸配列が全く判っていない場合は、一般に微生物リパーゼにおいて保存性の高いことが知られている活性中心残基近傍の配列に相当するオリゴヌクレオチドをプローブとして用いることもできる。

またあるいは、2つの異なる保存性配列に相当するオリゴヌクレオチドをプライマーとし、目的リパーゼ遺伝子をもつ染色体を鑄型としてDNAポリメラーゼにより2つのプライマー間の配列を酵素的に合成することにより得られた2本鎖DNAの双方をプローブとして用いることができる。

あるいは、リパーゼを産生しない細菌で染色体ライブラリーを作製し、リパーゼの難溶性基質を含む寒天上で平板培養する。リパーゼ遺伝子を含む染色体DNA断片を持つ細菌は、そのコロニーの周りの基質を分解するためクリアゾーンを形成することによって選抜できる。この方法によってもリパーゼをコードする遺伝子を単離することができるが、いずれの方法でも良い。

リパーゼの生産に関するタンパク質をコードする遺伝子は、リパーゼをコードする遺伝子の全部あるいは3'側の一部をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行うことによりリパーゼ遺伝子の下流のDNA断片として染色体DNAから単離することができる。

25 [宿主]

得られた遺伝子を導入するための宿主としては、その遺伝子が発現す

るものであればよく、例えばシュードモナス (Pseudomonas) 属細菌、エスシェリシア (Escherichia) 属細菌、バチルス (Bacillus) 属細菌等を用いることが出来る。

シュードモナス (Pseudomonas) 属細菌では、シュードモナス s p. (5 Pseudomonas sp.) SD 705 株 (受託番号FERM BP-4772) もしくはその変異株、シュードモナス・アルカリゲネス (Pseudomonas alcaligene s)、シュードモナス・シードアルカリゲネス (Pseudomonas pseudoalcaligenes)、シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina) が好ましい。より好ましくは、シュードモナス s p. (Pseudomonas sp.) 10 SD 705 株もしくはその変異株、シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina) SD 702 株 (受託番号FERM BP-4291) もしくはその変異株である。

エスシェリシア (Escherichia) 属細菌では、大腸菌 (Escherichia coli) が好ましい。

バチルス (Bacillus) 属細菌では、バチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis)、バチルス・アミロリクファシエンス (Bacillus amyloli quefaciens)、バチルス・リケニホルミス (Bacillus licheniformis)、バチルス・ファーマス (Bacillus firmus)、バチルス・レンタス (Bacillus lentus)、バチルス・アルカロフィラス (Bacillus alcalophilus) が好ましい。より好ましくは、バチルス s p. (Bacillus sp.) NK 20 S-21 株 (受託番号FERM BP-93-1) もしくはその変異株である。

#### [形質転換]

得られたリパーゼ遺伝子とリパーゼの生産に関与するタンパク質をコードする遺伝子を宿主菌に導入する。両遺伝子を同時に 1 つのベクターに、染色体中に存在していたのと同様の配列になるように連結するか、あるいは、それぞれを宿主細胞中で共存できる 2 つのベクターに別々に

連結する。

シードモナス (Pseudomonas) 属細菌以外を宿主として用いる場合は、宿主中で発現するように、その宿主で機能するプロモーター及びシグナル配列とターミネーターの間に挿入するように連結する。遺伝子を連結した組換えベクターを用いて宿主菌を形質転換する。2つの遺伝子を別々のベクターに連結した場合は、リパーゼ遺伝子のみを含む組換えベクターのみを用いて形質転換してもよいし、また、2つの組換えベクターで同時に形質転換してもよい。例えば、大腸菌を宿主として用いる場合、p U C 系や、p A C Y C 系等のプラスミドを用いることができる。

バチルス (Bacillus) 属細菌を宿主として用いる場合は、p U B 1 1 0 や、p E 1 9 4 のプラスミドを用いることができる。

シードモナス (Pseudomonas) 属細菌を宿主として用いる場合は、R S F 1 0 1 0 等のプラスミドを用いることができる。これらによって遺伝子は宿主菌の染色体外に安定に維持される。また、宿主菌内で複製できない形のDNAを用いて染色体内に組み込む方法によって遺伝子を導入してもよい。

#### [リパーゼの製造]

シードモナス (Pseudomonas) 属細菌を宿主として用いた場合、リパーゼは培養液中に分泌される。培養液からのリパーゼの分離精製は、培養液に硫安を加え、リパーゼを粗分画し、透析によって硫安を除去後、CMセルロースカラムで分別することにより SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一なバンドになるまでリパーゼを精製できる。しかし、リパーゼの生産、及び精製法は上記方法に限定されるものではなく、他の方法でももちろん可能である。

#### [リパーゼ S の性質]

以上の方針により得られるリパーゼ S は以下に挙げる性質を示す。

## (1) 作用

トリグリセリドに作用し、そのエステルを加水分解する。

## (2) 基質特異性

各種グリセリド、エステルなどを広範囲にわたり加水分解する。

## 5 (3) 作用pH及び至適pH

オリーブオイルを基質とし、pH-stat法を使用し、pH 8~12の範囲で測定した場合の作用pHが8~12、至適pHが約10.7。

## (4) 作用温度及び至適温度

10 トリオレインエマルジョンを基質として、30~80°Cの範囲で測定した場合の作用温度が30~80°C、至適温度が60±5°C。

## (5) 洗剤成分による影響

プロテアーゼを含む各種洗剤溶液中で高い活性を有する。

## 発明を実施するための最良の形態

15 本発明を実施例を挙げて説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

## 実施例1：染色体DNAの調製

20 シュードモナスsp. (Pseudomonas sp.) SD705株をL培地（ポリペプトン1%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム0.5%）に10%炭酸ナトリウムを3ml加え、pH9に調製した培地1000mlに植菌し、35°Cで1晩培養後、遠心分離によって上清を除去し、菌体を得た。これを0.4M塩化ナトリウム、10mM EDTAを含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH8）8mlに懸濁した。これにリゾチームとRNase Aをそれぞれ終濃度0.5mg/ml、0.05mg/mlになるように加え、37°Cで30分間穏やかに振とうし、更にドデシル硫酸ナトリウム（S

D S) を終濃度 1 % になるように加え、37 °C で 30 分間穏やかに振とうし、溶菌させた。その後、60 °C で 10 分間加温し、完全に可溶化させた。この溶液に T E 緩衝液 (1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8)) で飽和させたフェノールを等量加え、穏やかに 5 転倒混和し、遠心分離によって上層の水層を回収することを 3 回繰り返した。3 回目に回収した水層に -20 °C に冷やしたエタノールを 3 倍量加え、沈澱をプラスチック棒で巻取った。この沈澱をエタノールでリンスした後、減圧乾燥し、T E 緩衝液 1 mL に再溶解した。

#### 10 実施例 2 : 染色体 DNA ライブライリーの作製

染色体 DNA を制限酵素 Sau 3 A I で部分分解した後、アガロース電気泳動を行い、2 ~ 10 kbp の DNA 断片を回収した。一方、プラスミド pUC118 を BamH I で分解し、アルカリホスファターゼ処理を行った。両者を T 4 DNA リガーゼを用いて連結した。これを L 培地で培養した後、50 mM 塩化カルシウムで処理した大腸菌 JM101 株 0.3 mL に加え、0 °C で 30 分間インキュベートした後、L 培地を 1 mL になるように加え、37 °C で 1 時間振とうした。これをアンピシリン 50 ppm を含む L 平板培地に塗布し、37 °C で 1 晩培養した。この結果、約 1000 コロニーの形質転換体を得た。

20

#### 実施例 3 : オリゴヌクレオチドプローブの作製

精製したリバーゼの N 末端アミノ酸配列をプロテインシークエンサー Model 476A (アプライドバイオシステムズ社) で分析し、配列番号 5 に示す結果を得た。これに基づいて DNA 合成機で配列番号 6 に示すオリゴヌクレオチドプローブを合成した。これを、ECL (登録商標 ; 3'-oligolabelling and detection system, Amasham life science 社) を 25

用いて標識した。

#### 実施例4：リバーゼをコードする遺伝子の単離

約1000コロニーの形質転換体をし平板培地上に置いたナイロンフィルター上で37°Cで1晩培養した。フィルターを剥し、0.5M水酸化ナトリウム/1.5M塩化ナトリウムに浸した濾紙上で10分間溶菌させ、1.5M塩化ナトリウム/1Mトリス塩酸緩衝液(pH7)で浸した濾紙上で7分間、2回中和した。フィルターを80°C2時間焼成し、0.5%SDS/6×SSC(1×SSCは、150mM塩化ナトリウム/15mMクエン酸ナトリウム溶液。n×SSCは1×SSCのn倍の濃度の150mM塩化ナトリウム/15mMクエン酸ナトリウム溶液。)中で菌の残査を洗浄した。0.1%SDS/5×SSC/5×デンハート溶液(Denhardts solution)(0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ウシ血清アルブミン( BSA))中でフィルターのプレハイブリダイゼーションを60°Cで1時間行った。同様の溶液中に上記の標識したオリゴヌクレオチドプローブを加え、フィルターのハイブリダイゼーションを60°Cで1晩行った。その後、フィルターを0.1%SDS/1×SSCで60°Cで15分間、0.1%SDS/0.5×SSCで60°Cで15分間洗浄した。これを、ECL(登録商標；3'-oligolabelling and detection system)のプロトコルに従って検出した。

このようなコロニーハイブリダイゼーションの結果、いくつかの陽性コロニーを得た。得られたコロニーのうちの1つからプラスミドを回収し、制限酵素EcoRIとPstI、SacIとXbaIで分解した断片をアガロース電気泳動で分離して挿入断片の長さを推定したところ、約7kbpのDNA断片が得られたことが判った。このプラスミドpS1を各種制限酵素で分解し、制限酵素地図を作製した。さらにアガロー

スゲル電気泳動で分離してナイロンフィルターに吸着させた。コロニーハイブリダイゼーションと同様の手順でサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、約4 k b p の H i n d III - S a c I 断片および約2.7 k b p の E c o R I 断片にハイブリダイズした。この結果より、リ5 パーゼSをコードする遺伝子およびその生産に関するタンパク質をコードする遺伝子は約4 k b p の H i n d III - S a c I 断片および約2.7 k b p の E c o R I 断片に含まれていると推定された。図1にp S 1 の制限酵素地図を示す。ここで、白矢印はリパーゼ遺伝子、黒矢印はリパーゼの生産に関する遺伝子、P l a c はl a c プロモーター、o r i 10 は複製開始点、A p<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子を表わす。これらの断片を回収し、プラスミドp U C 1 1 8(宝酒造(株))のH i n d III - S a c I 部位またはE c o R I 部位にそれぞれ連結し、大腸菌J M 1 0 1 株を形質転換して、それぞれのDNA断片を含むプラスミドp S 1 S、p S 1 Eを得た。図2にp S 1 S、図3にp S 1 Eの制限酵素地図を示す15 (図中の記号は図1と同じである。)。

#### 実施例5：リパーゼ遺伝子のヌクレオチド配列決定

プラスミドp S 1 Eを用いて、サンガー(Sanger)のジデオキシ法20 (Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463) でリパーゼSをコードする遺伝子およびその生産に関するタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を決定した。すなわち、ダイデオキシターミネーターシーケンシングキット(アプライドバイオシステムズ社)を用い、DNAシークエンサー(Model 370A, アプライドバイオシステムズ社)によってヌクレオチド配列を解析した。その結果、配列番号2のようなリパーゼをコードするヌクレオチド配列および配列番号4のようなリパーゼ生産に関するタンパク質をコードす25

る遺伝子のヌクレオチド配列を得た。そこから推定されるアミノ酸配列を配列番号1および配列番号3で示す。

#### 実施例6：組換えベクターの構築および形質転換体の作製

##### 5 i) 大腸菌

リパーゼ遺伝子のリボソーム結合部位（SD配列）及び開始コドンを含む部分に相当する配列の5'末端にEcoRI部位が付加されるような配列番号7に示すオリゴヌクレオチドを化学合成した。このオリゴヌクレオチドと市販のM13プライマーRV（宝酒造（株））の2つのオリゴヌクレオチドをプラスミドpS1Eと混合し、ポリメラーゼチャーンリアクション（PCR）反応を行い、SD配列を含むリパーゼ遺伝子およびその生産に関するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNA断片を得た。この断片をEcoRIで完全に分解後、アガロースゲル電気泳動で分画し、アガロースゲル中より抽出精製した。プラスミドpUC118をEcoRIで完全に分解後、上記のように精製したDNA断片と混合し、T4DNAリガーゼによって連結反応を行い、大腸菌JM101株を形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換体を選択した。これらの形質転換体よりプラスミドDNAを抽出、精製、分析し、得られた形質転換体が、pUC118のEcoRI切断部位にリパーゼ遺伝子およびその生産に関するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNA断片が挿入され、lacプロモーターの下流でリパーゼ遺伝子およびその生産に関するタンパク質をコードする遺伝子が発現されるプラスミドを保持していることを確認し、このプラスミドをpSL1とした。図4にpSL1の制限酵素地図を示す（図中の記号は図1と同じである）。リパーゼ遺伝子の3'末端にEcoRI部位が付加されるような配列番号8に示すオリゴヌクレオチドを化学合成した。これと先に合成した

配列番号7に示すオリゴヌクレオチドをプラスミドpS1Eと混合し、  
ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）反応を行い、SD配列を  
含むリバーゼ遺伝子のみを含むDNA断片を得た。この断片をEcoR  
Iで完全に分解後、上記と同様にプラスミドpUC118と連結、形質  
5 転換し、pUC118のEcoRI切断部位にリバーゼ遺伝子のみを含  
むDNA断片が挿入され、lacプロモーターの下流でリバーゼ遺伝子  
が発現されるプラスミドpSL2を保持する形質転換体を得た。図5に  
pSL2の制限酵素地図を示す（図中の記号は図1と同じである。）。

ii) シュードモナス

10 プラスミドpS1SをHindIIIとSacIで完全に分解後、リバ  
ーゼ遺伝子およびその生産に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含  
むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分画し、アガロースゲル中より  
抽出精製した。プラスミドpMFY42をHindIIIとSacIで完全に分解後、上記のよう  
15 に精製したDNA断片と混合し、T4DNAリガーゼによって連結反応を行い、大腸菌JM101株を形質転換し、カナマ  
イシン耐性のコロニーを選択した。これらの形質転換体よりプラスミド  
DNAを抽出、精製、分析し、pMFY42のHindIIIとSacI切断部位の間にリバーゼ遺伝子およびその生産に関与するタンパク質をコ  
ードする遺伝子を含むDNA断片が挿入されたプラスミドpSP1を得  
20 た。図6にpSP1の制限酵素地図を示す。ここで、白矢印、黒矢印は  
図1と同じ。Km<sup>r</sup>はカナマイシン耐性遺伝子、Tc<sup>r</sup>はテトラサイクリ  
ン耐性遺伝子を表わす。

市販のM13プライマーM4（宝酒造（株））と配列番号9に示すオリゴヌクレオチドの2つのオリゴヌクレオチドをプラスミドpS1Sと  
25 混合し、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）反応を行い、リバーゼ遺伝子のみを含むDNA断片を得た。この断片をHindIIIとS

a c I で完全に分解後、上記と同様にプラスミド p M F Y 4 2 と連結し、p M F Y 4 2 の H i n d III と S a c I 切断部位の間にリパーゼ遺伝子のみを含むDNA断片が挿入されたプラスミド p S P 2 を得た。図7に p S P 2 の制限酵素地図を示す（図中の記号は図6と同じ）。

5 プラスミド p S P 1 および p S P 2 を用い、シュードモナス s p . S D 7 0 5 株（受託番号 FERM BP-4772）をエレクトロポーレーション法により形質転換し、カナマイシン耐性のコロニーを選択した。すなわち、まず S D 7 0 5 株を pH 9 に調整した L 液体培地 5 m l で O D = 0.5 まで生育させた後、遠心分離により菌体を回収した。この菌体を滅菌水に懸濁し、再び回収した後、0.5 m l の滅菌水に再懸濁した。この菌懸濁液にプラスミド DNA を加え、電極付きセルに移した後、高電圧電気パルスを与えた。その後、菌懸濁液に pH 9 の L 液体培地を 1 m l 加え、37°C で 1 時間振とう培養した後、カナマイシン 5 0 p p m 及びリパーゼの基質であるオリーブオイルのエマルジョンを含む pH 9 の L 平板培地に塗布した。35°C で 1 晩培養し、生育したコロニーのうち、コロニーの回りにクリアゾーンを形成したものを選抜し、形質転換株を得た。

10 シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina) S D 7 0 2 株（受託番号 FERM BP-4291）のリパーゼ欠損株である L D 9 株を同様に形質転換し、形質転換体を得た。なお、L D 9 株は、シュードモナス・メンドシナ S D 7 0 2 株に N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジンを作用させ、リパーゼ基質を含む平板培地にまいて培養し、クリアゾーンを形成しない株を選択することにより取得した。

### iii) バチルス

15 成熟リパーゼの N 末端に X b a I 部位が付加されるような配列番号 1 0 に示すオリゴヌクレオチドを化学合成した。また、リパーゼの生産に関与するタンパク質をコードする遺伝子の 3' 末端に X b a I 部位が付

加されるような配列番号11に示すオリゴヌクレオチドを化学合成した。これら2つのオリゴヌクレオチドをプラスミドpS1Eと混合し、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）反応を行い、成熟型リバーゼ遺伝子およびその生産に関するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNA断片を得た。この断片をXbaIで完全に分解後、上記と同様にプラスミドpUC118と連結し、pUC118のXbaI切断部位に成熟型リバーゼ遺伝子およびその生産に関するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNA断片が挿入されたプラスミドpSM1を得た。

リバーゼのC末端にXbaI部位が付加されるような配列番号12に示すオリゴヌクレオチドを化学合成した。このオリゴヌクレオチドと配列番号10に示すオリゴヌクレオチドをプラスミドpS1Eと混合し、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）反応を行い、成熟型リバーゼ遺伝子のみを含むDNA断片を得た。この断片をXbaIで完全に分解後、上記と同様にプラスミドpUC118と連結し、pUC118のXbaI切断部位に成熟型リバーゼ遺伝子およびその生産に関するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNA断片が挿入されたプラスミドpSM2を得た。

配列番号13、14に示すオリゴヌクレオチドを化学合成した。これら2つのオリゴヌクレオチドをプラスミドpSDT812（特開平1-141596号）と混合し、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）反応を行い、アルカリプロテアーゼのプロモーター領域及びプレプロ配列の一部を含むDNA断片を得た。この断片をEcoRIとXbaIで完全に分解後、上記と同様にプラスミドpUC118と連結し、pUC118のEcoRIとXbaI切断部位の間にアルカリプロテアーゼのプロモーター領域及びプレプロ配列の一部を含むDNA断片が挿入されたプラスミドpAP1を得た。

配列番号15、16に示すオリゴヌクレオチドを化学合成した。これら2つのオリゴヌクレオチドをプラスミドpSDT812と混合し、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）反応を行い、アルカリプロテアーゼのターミネーター領域を含むDNA断片を得た。この断片をXba IとHind IIIで完全に分解後、上記と同様にプラスミドpUC118と連結し、pUC118のXba IとHind III切断部位の間にアルカリプロテアーゼのターミネーター領域を含むDNA断片が挿入されたプラスミドpAP2を得た。

プラスミドpAP1をEco RIとXba Iで切断し、アルカリプロテアーゼのプロモーター領域及びプレプロ配列の一部を含むDNA断片を回収した。また、プラスミドpAP2をXba IとHind IIIで切断し、アルカリプロテアーゼのターミネーター領域を含むDNA断片を回収した。この2つの断片をプラスミドpUC118と連結し、pUC118のEco RIとHind III切断部位の間にアルカリプロテアーゼのプロモーター領域、プレプロ配列の一部及びターミネーター領域を含むDNA断片が挿入されたプラスミドpAP3を得た。図8にpAP1、pAP2、pAP3の構築過程を示す。ここで、Paprはアルカリプロテアーゼ遺伝子プロモーター、preはアルカリプロテアーゼプレ配列、proはアルカリプロテアーゼプロ配列、terはアルカリプロテアーゼ遺伝子ターミネーターを表わす。

プラスミドpSM1、プラスミドpSM2をXba Iで切断し、2つのリバーゼ遺伝子を含むDNA断片を回収した。この2つの断片をそれぞれプラスミドpAP3のXba I部位に連結し、プラスミドpAP4、プラスミドpAP5を得た。

25 プラスミドpAP4、プラスミドpAP5をEco RIとHind IIIで切断し、2つのリバーゼ遺伝子を含むDNA断片を回収した。この2

つの断片をそれぞれプラスミド p H Y 3 0 0 P L K (宝酒造(株))と連結し、バチルス・ズブチリス S D - 8 0 0 (特開平1-141596号に記載の方法により作製したプロテアーゼ低生産株)をプロトプラスト法により形質転換した。テトラサイクリン耐性で、かつ、0.5%オリーブオイルエマルジョンを含む寒天培地で大きなクリアゾーンを作る形質転換株を選択し、これらの形質転換体よりプラスミド DNA を抽出、精製し、p H Y 3 0 0 P L K の E c o R I と H i n d Ⅲ 切断部位の間にアルカリプロテアーゼのプロモーター領域、プレプロ配列の一部、成熟型リバーゼ遺伝子、または成熟型リバーゼ遺伝子およびその生産に関与するタンパク質をコードする遺伝子、及びアルカリプロテアーゼのターミネーター領域を含むDNA断片が挿入されたプラスミド p S B 1 、 p S B 2 を得た。図9に p S B 1 、図10に p S B 2 の構築過程を示す(図中の記号は図1、図6、図8と同じ)。

このプラスミドでバチルス N K S - 2 1 株 (受託番号 FERM BP-93-1) のプロテアーゼ欠損株をプロトプラスト法により形質転換し、テトラサイクリン耐性の形質転換株を選択した。なお、バチルス N K S - 2 1 株のプロテアーゼ欠損株は、バチルス N K S - 2 1 株に N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジンを作用させ、スキムミルクを含む平板培地にまいて培養し、クリアゾーンを形成しない株を選択することにより取得した。

#### 実施例7：リバーゼの調製

##### i) 大腸菌

プラスミド p S L 1 および p S L 2 を含む形質転換株を、それぞれアンピシリン 5 0 p p m を含む L 液体培地 5 m l 中、37°C で 1 晚振とう培養したものを 3 0 0 m l の同培地に 1 % 植菌し、37°C で 3 時間振と

う培養し、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度1 mM加えてlacプロモーターの発現を誘導し、さらに4時間振とう培養した。この培養物を遠心分離し、上清をとり、リパーゼ溶液を調製した。

5 ii) シュードモナス

プラスミドpSP1およびpSP2を含む形質転換株を、それぞれツイーン80を1%含有し、pH9に調整したリパーゼ生産培地300ml中で35°C、14時間振とう培養し、培地中にリパーゼを分泌生産させた。この培養物を遠心分離し、上清をとり、リパーゼ溶液を調製した。

10 さらに、これを硫安分画し、透析によって硫安を除去後、CMセルロースカラムにて処理し、SDSポリアクリルアミド電気泳動的に単一になるまで精製した。

iii) バチルス

15 プラスミドpSB1およびpSB2を含む形質転換株を、カゼイン1%、肉エキス1%、およびポリペプトン1%を含み、炭酸ナトリウムでpH7.5に調整した培地300ml中で35°C、66時間振とう培養し、培地中にリパーゼを分泌生産させた。この培養物を遠心分離し、上清をとり、リパーゼ溶液を調製した。

20 実施例8：リパーゼの活性

大腸菌およびシュードモナスの培養物から得たリパーゼ溶液の活性を測定した。活性測定はトリオレイン-ポリビニルアルコール (PVA) エマルジョンを基質とする測定法を用いて実施した。具体的には以下の方法により行った。

25 リパーゼ溶液0.1ml、1mM塩化カルシウムを含み、100mM ε-アミノカプロン酸、100mMピストリス (ビス [2-ヒドロキシ

エチル] イミノトリス [ヒドロキシメチル] メタン) および 100 mM  
5 T A P S (N-トリス [ヒドロキシメチル] メチル-3-アミノプロ  
パンスルホン酸) からなる混合液を水酸化ナトリウムで pH 調整した緩  
衝液 (pH 8.0) 0.4 ml、およびトリオレインエマルジョン 0.5 ml か  
らなる混合液を共栓付き試験管で 37 °C で 10 分加温して反応させ、反  
応停止液として 1 N 塩酸 0.2 ml を用いて反応を停止させた。ここで、  
トリオレインエマルジョンとしては、ポリビニルアルコール (P V A)  
10 2 % 水溶液 (ポバール P V A 117 (クラレ社) : ポバール P V A 20  
5 (クラレ社) = 9 : 1 (W/W)) 10 ml に 2.5 g のトリオレイン  
を加え、ホモジナイズしたものを用いた。反応停止後、n-ヘキサン 2  
ml、イソプロピルアルコール 2 ml、蒸留水 1 ml を加え激しく攪拌  
し、静置後ヘキサン層をサンプリングし、T L C - F I D 法 (ミナガワ  
ら、*Lipids*, 18, 732 (1983)) でオレイン酸を定量した。活性の単位は 1  
15 分間に 1 マイクロモルのオレイン酸を生成する酵素量を 1 ユニット  
(1 U) とした。

それぞれの形質転換体から得たりパーゼ溶液 (培養上清) の活性を、  
SD 705 株の活性を 100 としたときの相対値で表 1 に示した。リパ  
ーゼ遺伝子を導入した全ての形質転換体でリパーゼ活性の発現が認めら  
れたが、リパーゼの生産に関与するタンパク質をコードする遺伝子を含  
む DNA 断片が挿入されたプラスミドを含む形質転換体では、リパーゼ  
20 遺伝子のみを含む形質転換体よりもリパーゼ活性の発現量が多く、この  
遺伝子がリパーゼの生産量増大に効果があることが判った。

表 1

## リバーゼ活性

プラスミド/菌株	活性
なし/JM101	0
5 pUC118/JM101	0
pSL1/JM101	20
pSL2/JM101	10
なし/SD705	100
pMFY42/SD705	100
10 pSP1/SD705	520
pSP2/SD705	320
なし/LD9	0
pMFY42/LD9	0
pSP1/LD9	110
15 pSP2/LD9	50

## 実施例9：リバーゼの活性

バチルスの培養物から得たりバーゼの活性を測定した。活性測定は p-ニトロフェニルパルミテート (pNPP) を基質とした測定法で以下の方法で行った。

pNPPを2mg/mlになるようにイソプロピルアルコールに溶かした。このpNPP溶液と100mMビシン緩衝液 (Bicine buffer) (pH8.0) を1:10の割合で混ぜ、基質溶液とした。基質溶液0.5mlにリバーゼ溶液0.02mlを加え、室温で1~10分間反応させた後、1N塩酸を0.2ml加えて反応を止め、分光光度計で405nmの吸光度を測定した。活性の単位は1分間に405nmの吸光度を1上昇する

酵素量を 1 pNPP ユニット (1 pU) とした。

それぞれの形質転換体から得たリパーゼの活性を表 2 に示した。

表 2

5

リパーゼ活性

10

プラスミド/菌株	活性
なし/SD-800	0
pHY300PLK/SD-800	0
pSB1/SD-800	3.2
pSB2/SD-800	1.1
なし/NKS-21	0
pHY300PLK/NKS-21	0
pSB1/NKS-21	5.2
pSB2/NKS-21	2.3

15

産業上の利用可能性

20

本発明のリパーゼ遺伝子により、洗剤用、食品加工用、製紙工業用、製油工業用等の産業上有用な脂質分解酵素であるリパーゼ S の生産および改変が容易に行なえる。また、本発明のリパーゼの生産に関するタンパク質をコードする遺伝子により、リパーゼ S の生産を増大させることができ、産業上有用なリパーゼを経済上有利に提供することができる。

25

寄託された微生物に関する情報

明細書及び請求の範囲に記載した微生物の寄託機関、その宛名及び寄託日等の情報は下記の通りである。

(1) シュードモナス s.p. (Pseudomonas sp.) SD705 株 (受託番

号FERM BP-4772) :

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、  
 宛名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号、  
 平成5年（1993年）8月4日にP-13781号として寄託され、ブダペスト  
 5 条約に基づき平成6年（1994年）8月5日にシードモナス s.p.  
 （Pseudomonas sp.）SD705株（受託番号FERM BP-4772）として国  
 際寄託に移管された。

(2)シードモナス・メンドシナ（Pseudomonas alcaligenes）SD7  
 02株（受託番号FERM BP-4291）：

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、  
 宛名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号、  
 平成4年（1992年）5月1日にP-12944号として寄託され、ブダペスト  
 条約に基づき平成5年（1993年）5月12日にシードモナス s.p.  
 15 （Pseudomonas sp.）SD702株（受託番号FERM BP-4291）として国  
 際寄託に移管された。

(3)バチルス（Bacillus）NKS-21株（受託番号FERM BP-93-1）：

寄託機関：通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所、  
 宛名：日本国茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号、  
 微工研条寄第93号（FERM BP-93）の再寄託として昭和60年（1985  
 20 年）5月21日に微工研条寄託第93-1号（FERM BP-93-1）として国  
 際寄託された。

なお、上記(3)の寄託機関は、現在組織変更されて「通商産業省工業  
 技術院生命工学工業技術研究所」に引き継がれ、またその宛名は「日本  
 国茨城県つくば市東1丁目1番3号」に表示変更されている。

## 配列表

配列番号：1

配列の長さ：288

配列の型：アミノ酸

5 トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：シュードモナス s p. (Pseudomonas sp.)

株名：SD705

10 配列

Phe Gly Ser Ser Asn Tyr Thr Lys Thr Gln Tyr Pro Ile Val Leu Thr

1 5 10 15

His Gly Met Leu Gly Phe Asp Ser Leu Leu Gly Val Asp Tyr Trp Tyr

20 25 30

15 Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Lys Asp Gly Ala Thr Val Tyr Val Thr

35 40 45

Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Ala Arg Gly Glu Gln Leu Leu

50 55 60

Thr Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Ile Ser Gly Lys Pro Lys Val Asn

20 65 70 75 80

Leu Phe Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala

85 90 95

Val Arg Pro Asp Leu Val Ala Ser Val Thr Ser Ile Gly Ala Pro His

100 105 110

25 Lys Gly Ser Ala Thr Ala Asp Phe Ile Arg Gln Val Pro Glu Gly Ser

115 120 125

Ala Ser Glu Ala Ile Leu Ala Gly Ile Val Asn Gly Leu Gly Ala Leu  
 130 135 140  
 Ile Asn Phe Leu Ser Gly Ser Ser Ser Asp Thr Pro Gln Asn Ser Leu  
 145 150 155 160  
 5 Gly Thr Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala  
 165 170 175  
 Arg Phe Pro Gln Gly Val Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Asp Tyr  
 180 185 190  
 Val Val Asn Gly Val Arg Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Thr Ser Pro Leu  
 10 195 200 205  
 Thr Asn Val Leu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Leu Gly Ala Thr Ser Leu  
 210 215 220  
 Thr Phe Gly Phe Glu Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Arg Cys Ser Ser  
 225 230 235 240  
 15 Arg Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp  
 245 250 255  
 Glu Val Asn Gln Thr Phe Gly Leu Thr Ser Ile Phe Glu Thr Ser Pro  
 260 265 270  
 Val Ser Val Tyr Arg Gln Gln Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Gly Leu  
 20 275 280 285

配列番号 : 2

配列の長さ : 864

配列の型 : 核酸

25 鎮の数 : 二本鎮

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : シュードモナス s p. (Pseudomonas sp.)

株名 : SD705

5 配列の特徴

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1..864

特徴を決定した方法 : E

配列

10	TTC GGC TCC TCG AAC TAC ACC AAG ACC CAG TAC CCG ATC GTC CTG ACC	48
	Phe Gly Ser Ser Asn Tyr Thr Lys Thr Gln Tyr Pro Ile Val Leu Thr	
	1 5 10 15	
	CAC GGC ATG CTC GGT TTC GAC AGC CTG CTT GGA GTC GAC TAC TGG TAC	96
	His Gly Met Leu Gly Phe Asp Ser Leu Leu Gly Val Asp Tyr Trp Tyr	
15	20 25 30	
	GGC ATT CCC TCA GCC CTG CGT AAA GAC GGC GCC ACC GTC TAC GTC ACC	144
	Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Lys Asp Gly Ala Thr Val Tyr Val Thr	
	35 40 45	
	GAA GTC AGC CAG CTC GAC ACC TCC GAA GCC CGA GGT GAG CAA CTG CTG	192
20	Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Ala Arg Gly Glu Gln Leu Leu	
	50 55 60	
	ACC CAA GTC GAG GAA ATC GTG GCC ATC AGC GGC AAG CCC AAG GTC AAC	240
	Thr Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Ile Ser Gly Lys Pro Lys Val Asn	
	65 70 75 80	
25	CTG TTC GGC CAC AGC CAT GGC GGG CCT ACC ATC CGC TAC GTT GCC GCC	288
	Leu Phe Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala	

	85	90	95	
	GTG CGC CCG GAT CTG GTC GCC TCG GTC ACC AGC ATT GGC GCG CCG CAC			336
	Val Arg Pro Asp Leu Val Ala Ser Val Thr Ser Ile Gly Ala Pro His			
	100	105	110	
5	AAG GGT TCG GCC ACC GCC GAC TTC ATC CGC CAG GTG CCG GAA GGA TCG			384
	Lys Gly Ser Ala Thr Ala Asp Phe Ile Arg Gln Val Pro Glu Gly Ser			
	115	120	125	
	GCC AGC GAA GCG ATT CTG GCC GGG ATC GTC AAT GGT CTG GGT GCG CTG			432
	Ala Ser Glu Ala Ile Leu Ala Gly Ile Val Asn Gly Leu Gly Ala Leu			
10	130	135	140	
	ATC AAC TTC CTT TCC GGC AGC AGT TCG GAC ACC CCA CAG AAC TCG CTG			480
	Ile Asn Phe Leu Ser Gly Ser Ser Ser Asp Thr Pro Gln Asn Ser Leu			
	145	150	155	160
	GGC ACG CTG GAG TCA CTG AAC TCC GAA GGC GCC GCA CGG TTT AAC GCC			528
15	Gly Thr Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala			
	165	170	175	
	CGC TTC CCC CAG GGG GTA CCA ACC AGC GCC TGC GGC GAG GGC GAT TAC			576
	Arg Phe Pro Gln Gly Val Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Asp Tyr			
	180	185	190	
20	GTG GTC AAT GGC GTG CGC TAT TAC TCC TGG AGC GGC ACC AGC CCG CTG			624
	Val Val Asn Gly Val Arg Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Thr Ser Pro Leu			
	195	200	205	
	ACC AAC GTA CTC GAC CCC TCC GAC CTG CTG CTC GGC GCC ACC TCC CTG			672
	Thr Asn Val Leu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Leu Gly Ala Thr Ser Leu			
25	210	215	220	
	ACC TTC GGT TTC GAG GCC AAC GAT GGT CTG GTC GGA CGC TGC AGC TCC			720

Thr Phe Gly Phe Glu Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Arg Cys Ser Ser  
 225 230 235 240  
 CGG CTG GGT ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC 768  
 Arg Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp  
 5 245 250 255  
 GAG GTG AAC CAG ACC TTC GGG CTG ACC AGC ATC TTC GAG ACC AGC CCG 816  
 Glu Val Asn Gln Thr Phe Gly Leu Thr Ser Ile Phe Glu Thr Ser Pro  
 260 265 270  
 GTA TCG GTC TAT CGC CAG CAA GCC AAT CGC CTG AAG AAC GCC GGG CTC 864  
 10 Val Ser Val Tyr Arg Gln Gln Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Gly Leu  
 275 280 285

配列番号 : 3

配列の長さ : 335

15 配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : シュードモナス s.p. (Pseudomonas sp.)

20 株名 : SD705

配列

Met Lys Pro Leu Ile Tyr Leu Pro Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Leu

1 5 10 15

Gly Trp His Leu Ser Thr Pro Ala Pro Ser Pro Ser Ser Ala Ser Pro

25 20 25 30

Ala Pro Pro Gln Val Ser Ser Glu Lys Pro Ala Thr Ala His Met Asp

	35	40	45
	Leu Thr Arg Pro Val Ala Arg Ser Thr Asp Gln His Leu Pro Ala Ser		
	50	55	60
	Leu Arg Asp Thr Asp Val Asp Gly Gln Leu Glu Val Asp Ala Gln Gly		
5	65	70	75
	Asn Leu Val Ile Ser Asp Gln Leu Arg His Leu Phe Asp Tyr Phe Phe		
	85	90	95
	Ser Thr Val Gly Glu Gln Ser Phe Glu Gln Ala Ser Thr Gly Ile Arg		
	100	105	110
10	Asp Tyr Leu Ala Ser Gln Leu Arg Glu Pro Ala Leu Gly Gln Ala Leu		
	115	120	125
	Asp Leu Leu Asp Arg Tyr Ile Asn Tyr Lys Thr Glu Leu Val Glu Leu		
	130	135	140
	Glu Arg Arg Phe Pro Met Val Thr Glu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Arg		
15	145	150	155
	Glu Asp Ala Val Gln Arg Leu Arg Ala Ser Leu Phe Asn Ala Gln Glu		
	165	170	175
	His Ala Ala Phe Phe Ala Ser Glu Glu Val Tyr Asn Gln Phe Thr Leu		
	180	185	190
20	Glu Arg Leu Ala Ile Leu His Asp Pro Ser Leu Asp Pro Gln Asp Lys		
	195	200	205
	Ala Glu Arg Ile Glu Arg Leu Arg Glu Gly Leu Pro Asp Glu Leu Gln		
	210	215	220
	Gln Leu Leu Val Pro Gln Leu His Leu Thr Leu Arg Gln Gln Thr Gln		
25	225	230	235
	Gln Leu Leu Glu Gln Gly Ala Glu Pro Glu Gln Leu Arg Gln Leu Arg		

	245	250	255
	Leu Asn Leu Val Gly Pro Gln Ala Thr Glu Arg Leu Glu Ala Leu Asp		
	260	265	270
	Arg Gln Arg Ser Glu Trp Asp Gln Arg Leu Ser Gly Phe Asn Arg Glu		
5	275	280	285
	Arg Gln Ala Ile Ile Ser Gln Pro Gly Leu Ala Asp Ser Asp Lys Gln		
	290	295	300
	Ala Ala Ile Glu Ala Leu Leu His Glu Gln Phe Ser Glu His Glu Arg		
	305	310	315
10	Leu Arg Val Ser Ser Leu Leu Gly Leu Asp Ser Arg Ala Glu Arg		
	325	330	335

配列番号 : 4

配列の長さ : 1005

15 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

20 生物名 : シュードモナス s p. (Pseudomonas sp.)

株名 : SD705

配列の特徴

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1..1005

25 特徴を決定した方法 : E

配列

	ATG AAG CCG CTG ATT TAT CTG CCT TTG CTT CTT GGC CTG GGG CTG CTC	48		
	Met Lys Pro Leu Ile Tyr Leu Pro Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Leu			
1	5	10		
	GGC TGG CAC CTG AGC ACG CCG GCA CCC AGC CCA TCC AGC GCC TCA CCA	96		
5	Gly Trp His Leu Ser Thr Pro Ala Pro Ser Pro Ser Ser Ala Ser Pro			
	20	25	30	
	GCG CCG CCA CAA GTC AGC AGT GAA AAA CCT GCC ACG GCT CAC ATG GAC	144		
	Ala Pro Pro Gln Val Ser Ser Glu Lys Pro Ala Thr Ala His Met Asp			
	35	40	45	
10	CTG ACC CGC CCG GTG GCC CGC AGC ACC GAC CAG CAT CTG CCC GCC TCG	192		
	Leu Thr Arg Pro Val Ala Arg Ser Thr Asp Gln His Leu Pro Ala Ser			
	50	55	60	
	CTG CGC GAT ACC GAC GTC GAT GGC CAG CTG GAG GTC GAC GCC CAG GGC	240		
	Leu Arg Asp Thr Asp Val Asp Gly Gln Leu Glu Val Asp Ala Gln Gly			
15	65	70	75	80
	AAT CTG GTG ATT TCC GAC CAG CTG CGC CAC CTG TTC GAC TAT TTC TTC	288		
	Asn Leu Val Ile Ser Asp Gln Leu Arg His Leu Phe Asp Tyr Phe Phe			
	85	90	95	
	AGC ACC GTC GGC GAA CAG TCG TTC GAG CAG GCC AGC ACC GGT ATC CGC	336		
20	Ser Thr Val Gly Glu Gln Ser Phe Glu Gln Ala Ser Thr Gly Ile Arg			
	100	105	110	
	GAC TAT CTG GCC AGC CAG CTG CGT GAA CCG GCT CTG GGT CAG GCC CTG	384		
	Asp Tyr Leu Ala Ser Gln Leu Arg Glu Pro Ala Leu Gly Gln Ala Leu			
	115	120	125	
25	GAT CTG CTG GAT CGC TAT ATC AAC TAC AAG ACC GAG CTG GTG GAA CTG	432		
	Asp Leu Leu Asp Arg Tyr Ile Asn Tyr Lys Thr Glu Leu Val Glu Leu			

	130	135	140	
	GAG CGA CGC TTC CCG ATG GTG ACC GAG CTG GAC GGC CTG CGT GCC CGT			480
	Glu Arg Arg Phe Pro Met Val Thr Glu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Arg			
5	145	150	155	160
	GAA GAT GCC GTA CAG CGC CTG CGC GCC AGC CTG TTC AAC GCG CAG GAG			528
	Glu Asp Ala Val Gln Arg Leu Arg Ala Ser Leu Phe Asn Ala Gln Glu			
	165	170	175	
	CAC GCC GCC TTC TTC GCC AGC GAA GAG GTC TAT AAC CAG TTC ACT CTT			576
	His Ala Ala Phe Phe Ala Ser Glu Glu Val Tyr Asn Gln Phe Thr Leu			
10	180	185	190	
	GAG CGT CTG GCG ATA CTG CAC GAC CCG TCG CTG GAT CCG CAG GAC AAG			624
	Glu Arg Leu Ala Ile Leu His Asp Pro Ser Leu Asp Pro Gln Asp Lys			
	195	200	205	
	GCC GAG CGG ATC GAA CGT CTG CGC GAA GGG CTA CCC GAC GAG TTG CAA			672
15	Ala Glu Arg Ile Glu Arg Leu Arg Glu Gly Leu Pro Asp Glu Leu Gln			
	210	215	220	
	CAA TTG CTG GTA CCG CAA TTA CAC CTG ACC CTG CGC CAG CAG ACC CAG			720
	Gln Leu Leu Val Pro Gln Leu His Leu Thr Leu Arg Gln Gln Thr Gln			
	225	230	235	240
20	CAG TTG CTG GAG CAA GGC GCC GAG CCG GAA CAG CTA CGC CAA TTG CGC			768
	Gln Leu Leu Glu Gln Gly Ala Glu Pro Glu Gln Leu Arg Gln Leu Arg			
	245	250	255	
	CTG AAC CTG GTC GGC CCC CAG GCA ACC GAA CGC CTG GAG GCA CTG GAC			816
	Leu Asn Leu Val Gly Pro Gln Ala Thr Glu Arg Leu Glu Ala Leu Asp			
25	260	265	270	
	CGC CAG CGC AGC GAA TGG GAT CAG CGC CTG AGC GGG TTC AAT CGC GAA			864

Arg Gln Arg Ser Glu Trp Asp Gln Arg Leu Ser Gly Phe Asn Arg Glu  
 275 280 285  
 CGG CAG GCG ATC ATC AGC CAG CCG GGG CTG GCC GAC AGT GAC AAG CAG 912  
 Arg Gln Ala Ile Ile Ser Gln Pro Gly Leu Ala Asp Ser Asp Lys Gln  
 5 290 295 300  
 GCC GCG ATT GAG GCC CTG CTG CAC GAG CAG TTC AGT GAG CAT GAG CGG 960  
 Ala Ala Ile Glu Ala Leu Leu His Glu Gln Phe Ser Glu His Glu Arg  
 305 310 315 320  
 CTG AGG GTC AGC AGT CTG CTG GGA CTC GAT AGC CGC GCC GAA CGC 1005  
 10 Leu Arg Val Ser Ser Leu Leu Gly Leu Asp Ser Arg Ala Glu Arg  
 325 330 335

配列番号：5

配列の長さ：26

15 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

20 生物名：シュードモナス s.p. (Pseudomonas sp.)

株名：SD705

配列

Phe Gly Ser Ser Asn Tyr Thr Lys Thr Gln Tyr Pro Ile Val Leu Thr

1 5 10 15

25 His Gly Met Leu Gly Phe Asp Ser Leu Leu

20 25

配列番号： 6

配列の長さ： 20

配列の型：核酸

5 鎮の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AACTACACNA AGACNCAGTA 20

10

配列番号： 7

配列の長さ： 30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

15

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGGAATTCA GGACTCGCAT TATGCGAAC 30

20

配列番号： 8

配列の長さ： 30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

25

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTTGAATTCA GAGCCCGGCG TTCTTCAGGC 30

配列番号：9

配列の長さ：30

5 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

10 TTTGAGCTCA GAGCCCGGCG TTCTTCAGGC 30

配列番号：10

配列の長さ：30

配列の型：核酸

15 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AAATCTAGAT TCGGCTCCTC GAACTACACC 30

20

配列番号：11

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

25 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

CCCTCTAGAC TAGCGTTCGG CGCGGCTATC 30

配列番号：12

5 配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

10 配列

CCCTCTAGAT CAGAGCCCCGG CGTTCTTCAG 30

配列番号：13

配列の長さ：30

15 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

20 CCCGAATTCA TACGAATTAA AGTTGAAAGC 30

配列番号：14

配列の長さ：30

配列の型：核酸

25 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AAATCTAGAG TTGAAACCAA TTAAGTACTC 30

5 配列番号：15

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGTCTAGAT CCCTAAGGAT GTACTGGATG 30

配列番号：16

15 配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

20 配列

TTTAAGCTTA GAAACTCAAC TGTACAGTG 30

## 請求の範囲

- 1) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列をコードする遺伝子。
- 2) 配列番号2に記載されたリパーゼをコードするヌクレオチド配列を含む遺伝子。
- 3) 配列番号3に記載されたアミノ酸配列をコードする遺伝子。
- 4) 配列番号4に記載されたリパーゼの生産に関するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む遺伝子。
- 5) シュードモナス (Pseudomonas) 属細菌由来の請求の範囲第1項ないし第4項のいずれかの項に記載の遺伝子。
- 6) シュードモナス s p. (Pseudomonas sp.) S D 7 0 5 株 (FERM BP-4772) 由来の請求の範囲第1項ないし第4項のいずれかの項に記載の遺伝子。
- 7) 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれかの項に記載された遺伝子のヌクレオチド配列の全部もしくは一部を含むDNA。
- 8) 請求の範囲第3項または第4項に記載された遺伝子のヌクレオチド配列の全部もしくは一部とハイブリダイズするDNA。
9. 請求の範囲第1項ないし第4項のいずれかの項に記載された遺伝子の少なくとも1つを宿主微生物細胞内で発現するように宿主微生物細胞内で複製可能なベクターに組み込んだ組換えDNA。
- 20 10) 請求の範囲第1項ないし第4項のいずれかの項に記載された遺伝子の少なくとも1つを微生物染色体上に相同組換えによって組み込んだ組換え染色体DNA。
- 11) 請求の範囲第9項に記載の組換えDNAで形質転換された形質転換宿主微生物。
- 25 12) 請求の範囲第10項に記載の組換え染色体DNAを含む形質転換微生物。

13) 微生物がエスシェリシア (*Escherichia*) 属細菌、シュードモナス属細菌 (Pseudomonas)、またはバチルス属細菌 (Bacillus) である請求の範囲第11項に記載の形質転換微生物。

14) 微生物がシュードモナス属細菌 (Pseudomonas)、またはバチルス属細菌 (Bacillus) である請求の範囲第12項記載の形質転換微生物。

15) 微生物がシュードモナス・アルカリゲネス (Pseudomonas alcaligenes)、シュードモナス・シュードアルカリゲネス (Pseudomonas pseudoalcaligenes)、シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina)、またはバチルス・ズブチリス (Bacillus subutilis) である請求の範囲第11項または第12項記載の形質転換微生物。

16) 微生物がシュードモナス s p. (Pseudomonas sp.) S D 7 0 5 株、シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas alcaligenes) S D 7 0 2 株、バチルス (Bacillus) N K S - 2 1 株、またはそれらの変異株である請求の範囲第11項または第12項記載の形質転換微生物。

17) 請求の範囲第11項ないし第16項のいずれかの項に記載の形質転換宿主細胞の少なくとも1つを培養してリパーゼを含む培養物を得、リパーゼを単離することを特徴とするリパーゼの製造方法。

## 図 面

図 1

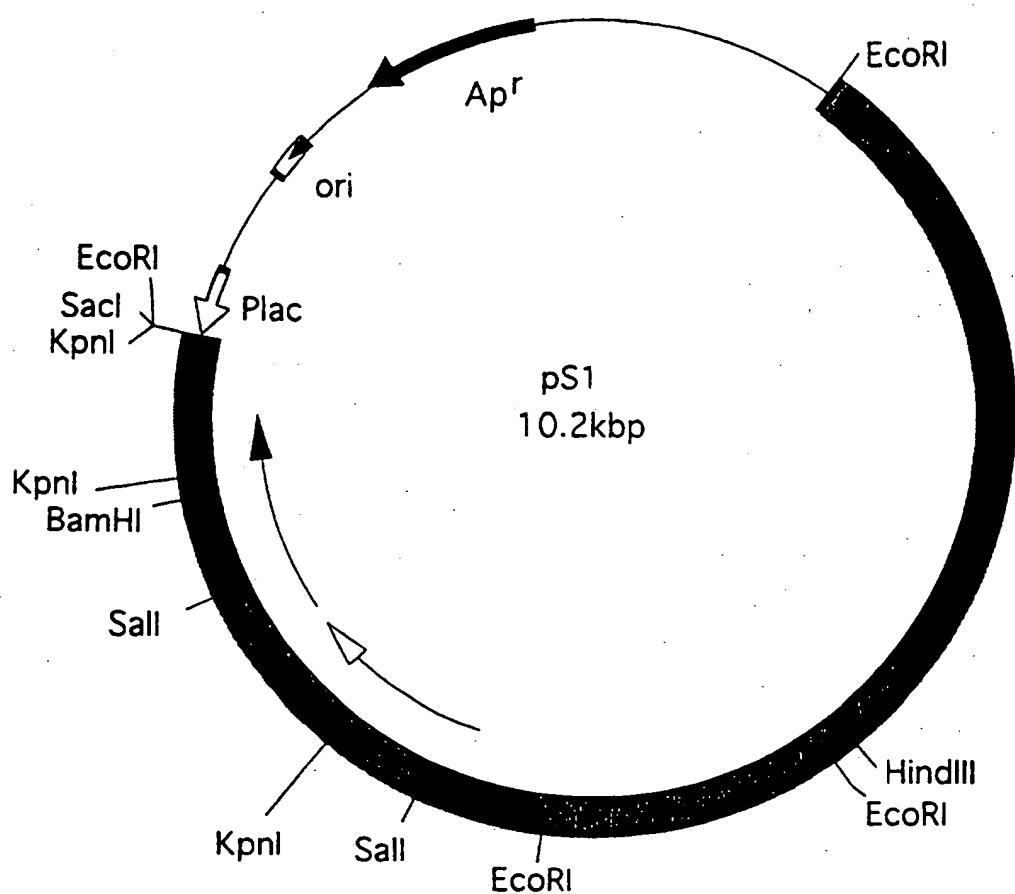


図 2

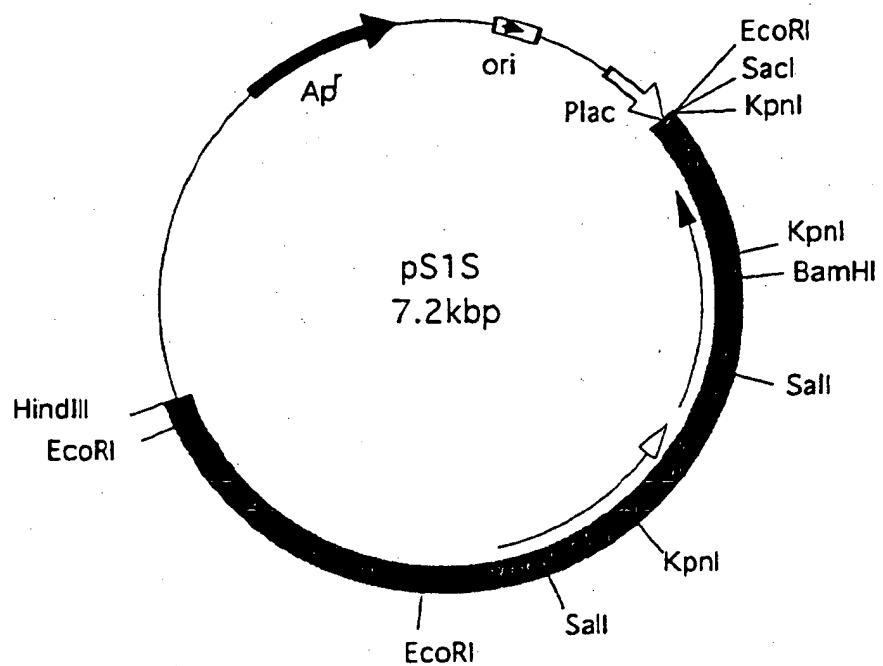


図 3

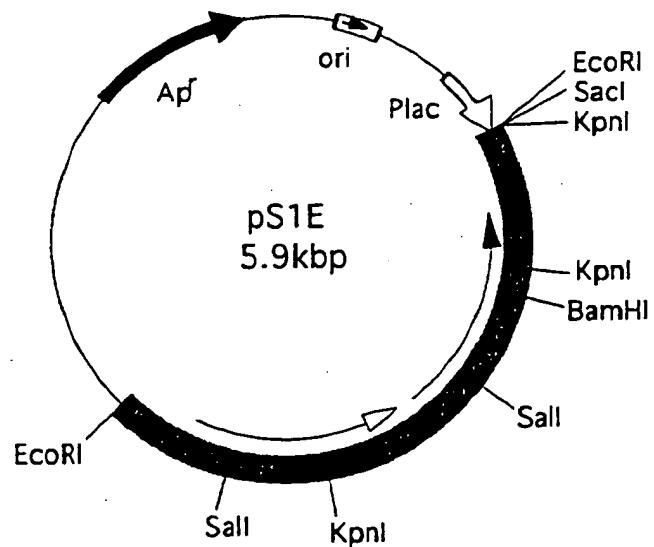


図 4

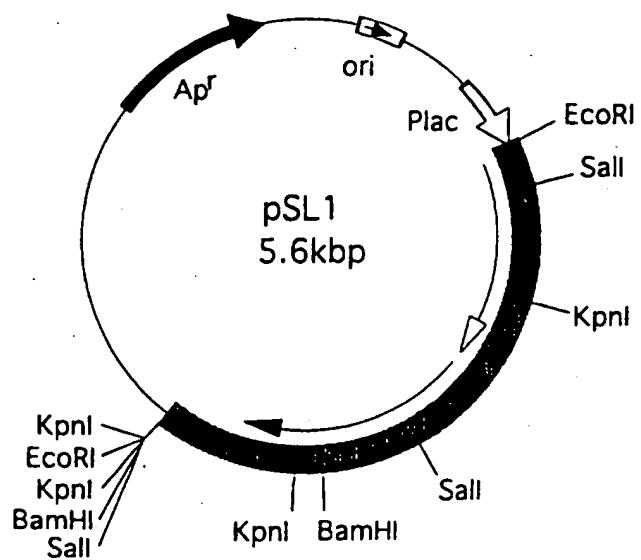


図 5

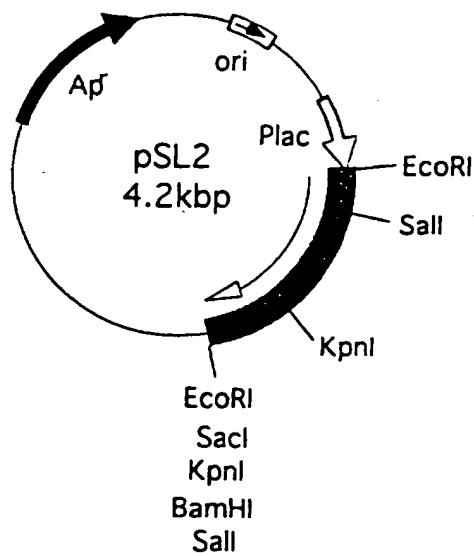


図 6

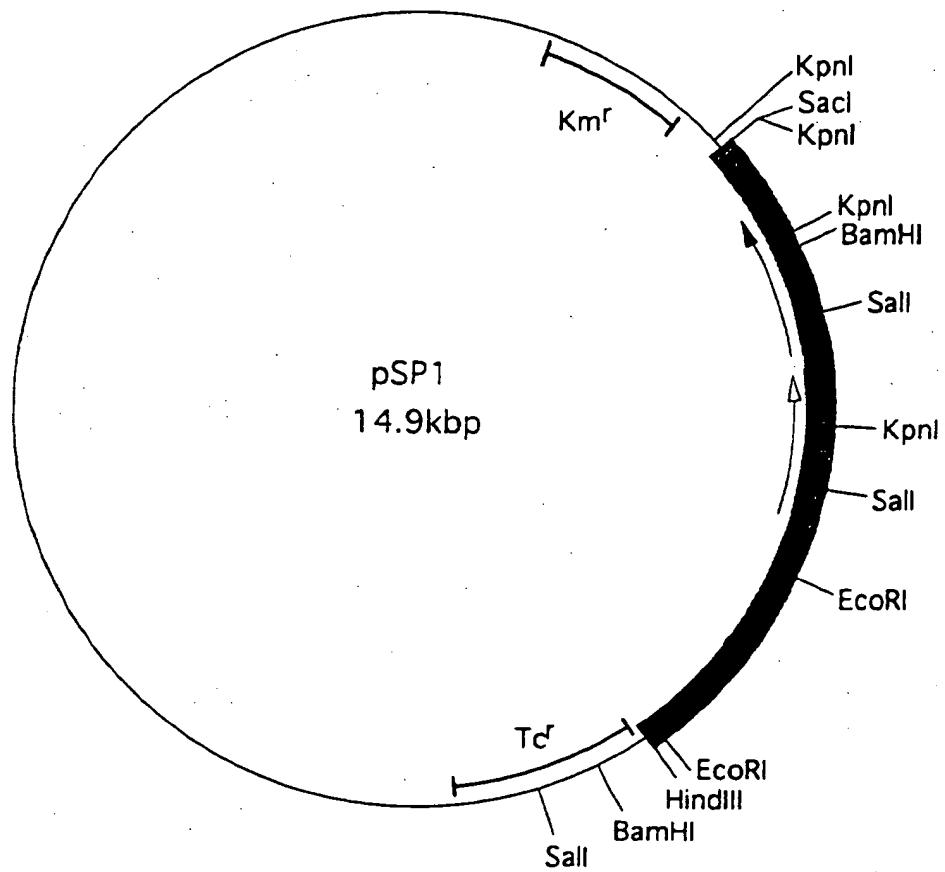


図 7

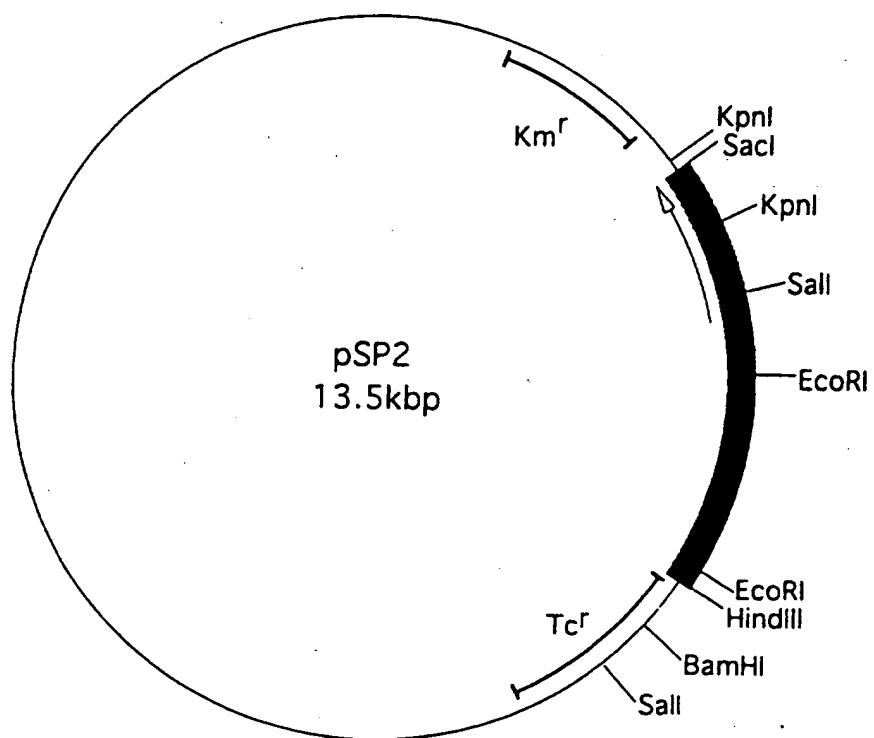


図 8

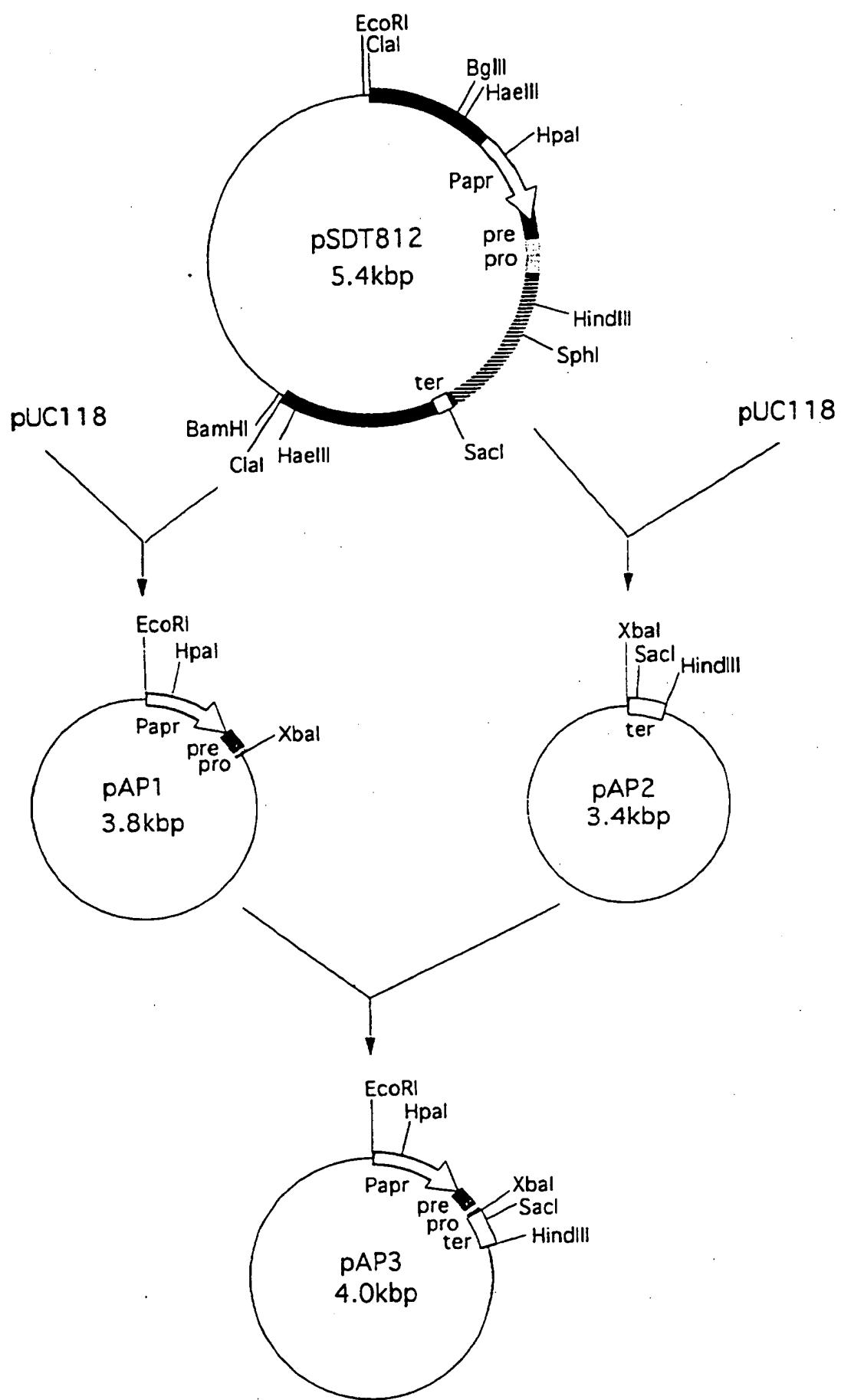


図 9

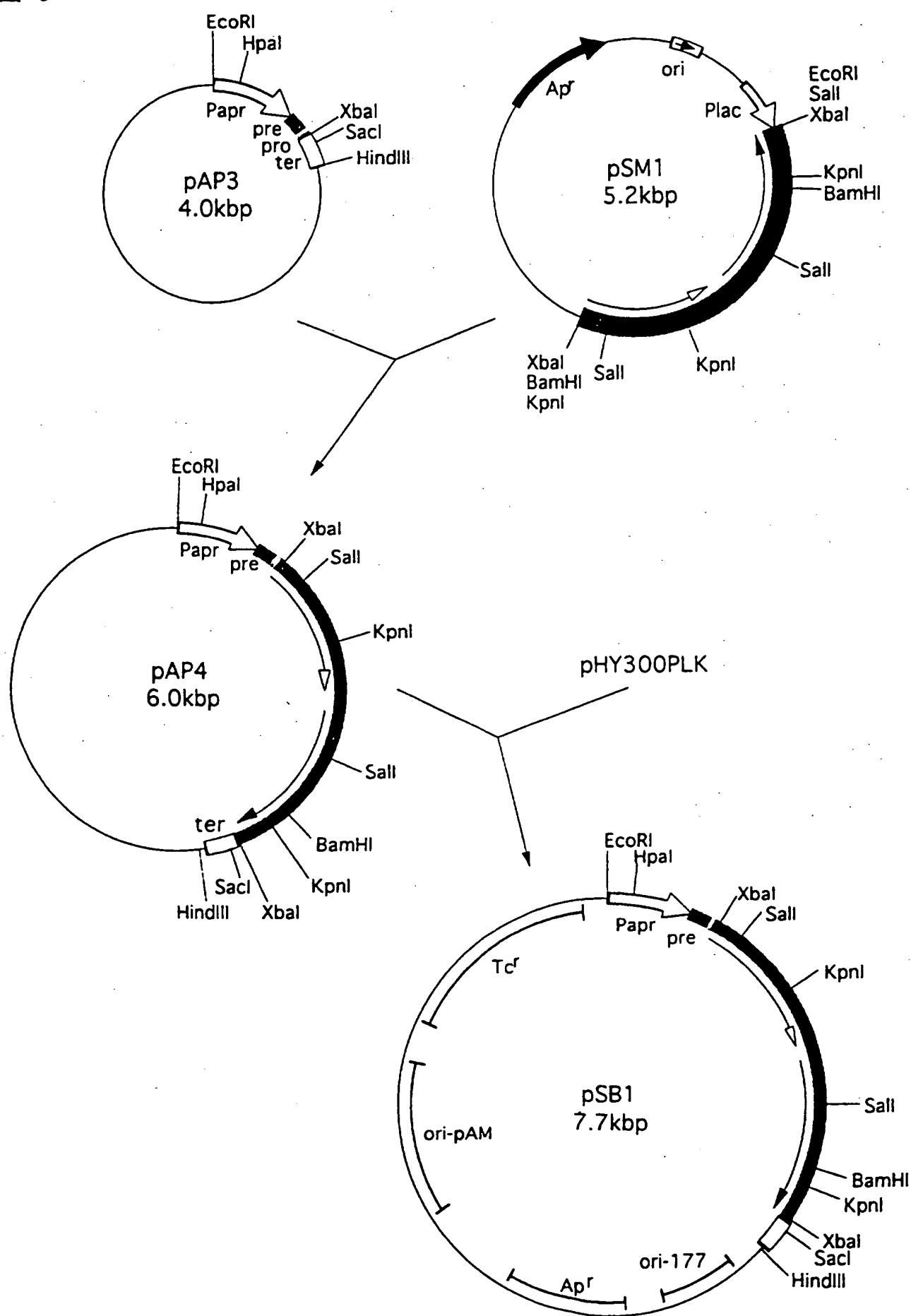
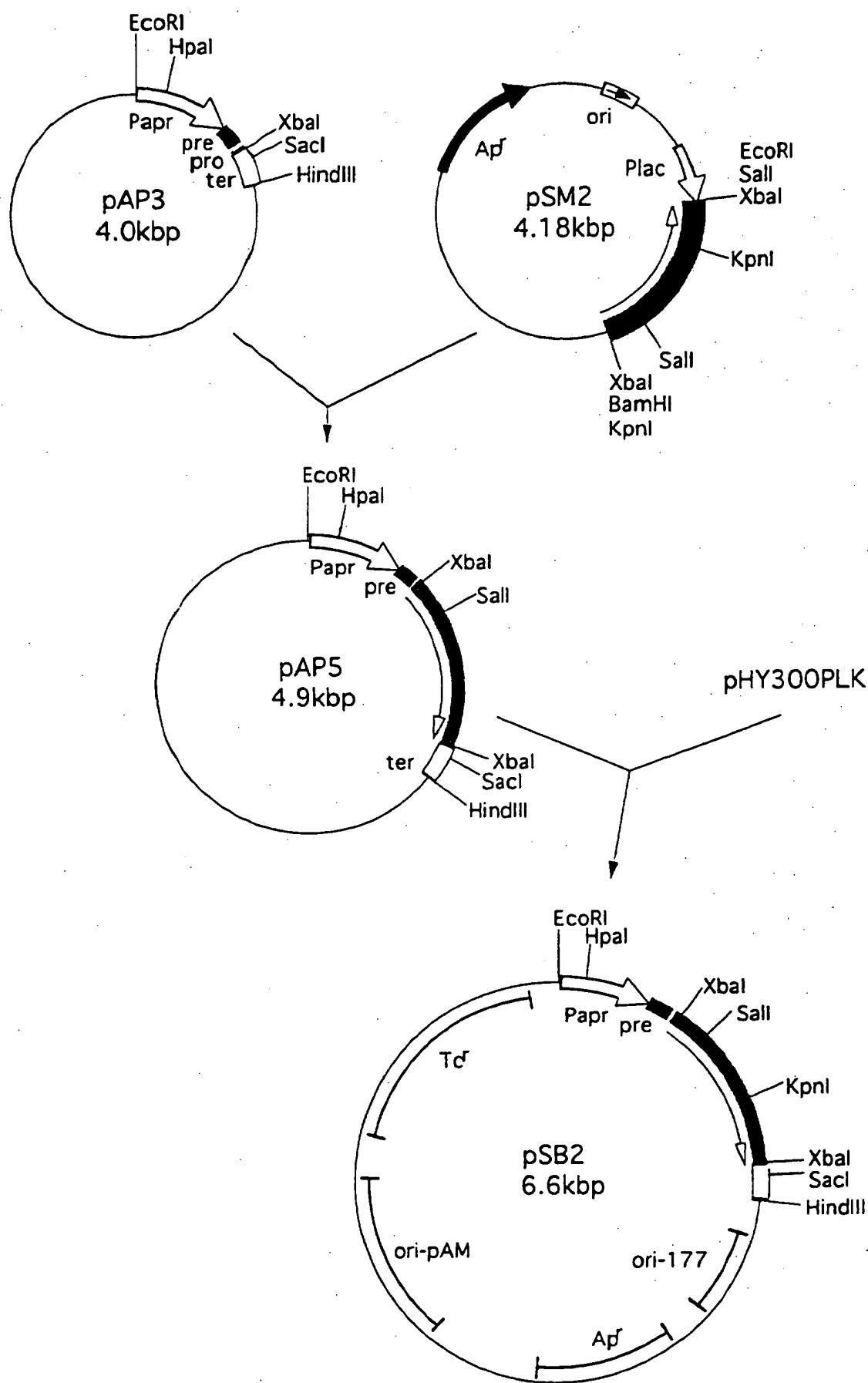


図 10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00426

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N9/20, 15/55 // (C12N9/20, C12R1:38), (C12N15/55, C12R1:38)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N9/20, 15/55

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GBF Monogr., 16 (Lipases) (1991), pp. 417-20	1 - 17
A	Journal of Biochemistry (Tokyo), Vol. 112, No. 5 (1992), pp. 598-603	1 - 17
A	JP, 6-153942, A (Godō Shusei K.K.), June 3, 1994 (03. 06. 94)	1 - 17
P,A	JP, 7-67636, A (Showa Denko K.K.), March 14, 1995 (14. 03. 95) & WO, 95-06720, A	1 - 17
A	JP, 6-38746, A (Showa Denko K.K.), February 15, 1994 (15. 02. 94) & EP, 571,982, A1 & US, 5,454,971, A	1 - 17
A	JP, 6-209772, A (Showa Denko K.K.), August 2, 1994 (02. 08. 94) & EP, 571,982, A1 & US, 5,454,971, A	1 - 17

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 15, 1996 (15. 05. 96)

Date of mailing of the international search report

May 28, 1996 (28. 05. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1° C12N9/20, 15/55// (C12N9/20, C12R1:38),  
(C12N15/55, C12R1:38)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1° C12N9/20, 15/55

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GBF Monogr., 16(Lipases) (1991), pp. 417-20	1-17
A	Journal of Biochemistry (Tokyo), Vol. 112, No. 5 (1992), pp. 598-603	1-17
A	JP, 6-153942, A (合同酒精株式会社) 3.6月. 1994 (03.06.94)	1-17
P, A	JP, 7-67636, A (昭和電工株式会社) 14.3月. 1995 (14.03.95) & WO, 95-06720, A	1-17
A	JP, 6-38746, A (昭和電工株式会社) 15.2月. 1994 (15.02.94) & EP, 571, 982, A1 & US, 5, 454, 971, A	1-17
A	JP, 6-209772, A (昭和電工株式会社) 2.8月. 1994 (02.08.94) & EP, 571, 982, A1 & US, 5, 454, 971, A	1-17

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 15. 05. 96

国際調査報告の発送日 28.05.96

国際調査機関の名称及びあて先  
 日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号 100  
 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員) 4B 8827  
 村上 騎見高

電話番号 03-3581-1101 内線 3448